



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A APLICAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA MEDICINA REGENERATIVA

Trabalho submetido por
Ana Rita dos Santos Esteves Cajado
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A APLICAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA MEDICINA REGENERATIVA

Trabalho submetido por
Ana Rita dos Santos Esteves Cajado
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Evguenia Bekman

Novembro de 2017

Agradecimentos

Primeiro que tudo, um agradecimento muito especial aos meus pais que me deram a possibilidade de realizar mais um sonho, e que me acompanharam e apoiaram em todo este percurso acadêmico. Um obrigada à minha família por sempre acreditarem em mim, me motivarem de dia para dia e por estarem sempre presentes independentemente da distância que nos separa.

À minha orientadora, Prof. Doutora Evguenia Bekman, obrigada por ter aceite acompanhar-me nesta jornada, pelo seu apoio, pelas suas críticas e sobretudo pela sua disponibilidade.

A esta admirável instituição, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, e aos docentes obrigada por acolherem tão bem os alunos e nos proporcionarem um ensino tão completo e tão diferenciado.

Às minhas companheiras de todas as horas, Ana Dourado e Susana Carvalho, convosco aprendi muito, obrigada por todo o vosso apoio durante estes cinco anos, sem vocês tudo teria sido muito mais difícil e com muito menos graça. Levo comigo todas as alegrias que partilhámos, todos os sucessos que alcançámos e as melhores amizades que a universidade me deu.

Por último, mas não por isso o menos importante, um obrigada especial ao Daniel por sempre me ter apoiado, motivado e acreditado em mim nos momentos em que eu não o consegui fazer. Um obrigado é pouco por toda tua paciência e por aturares os meus momentos de pânico e stress neste percurso.

Resumo

As células estaminais pluripotentes, isto é, as células estaminais embrionárias e as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) têm como propriedades principais e distintivas as capacidades de se autorrenovarem e diferenciarem em diferentes tipos celulares. Ao longo do tempo as células estaminais embrionárias revelaram possuir as qualidades exigidas para fins de investigação científica e para a área da medicina, no entanto, ao contrário das iPSCs, suscitam sérias questões éticas que limitam a sua aplicação na prática clínica.

A descoberta das iPSCs trouxe a possibilidade de converter células diferenciadas em células estaminais multipotentes com a capacidade de dar origem a todos os tipos celulares através de técnicas de reprogramação celular. Existem variadas aplicações onde estas células podem incidir, incluindo nos modelos de doença *in vitro* para o estudo dos mecanismos de doenças, para a pesquisa e descoberta de fármacos e na medicina regenerativa. As iPSCs constituem uma grande promessa na medicina regenerativa, sobretudo ao nível da terapia celular de substituição. No entanto ainda não são totalmente compreendidos os mecanismos subjacentes a esta aplicação e ainda existem bastantes riscos associados que ainda não são suficientemente controlados para evitar reações indesejadas.

Neste trabalho é feita uma revisão sobre as áreas de aplicação desta tecnologia, incidindo sobretudo na medicina regenerativa e no estado atual da sua aplicação na prática clínica, bem como os aspetos que existem a melhorar para que esta constitua uma terapia celular segura e eficaz num futuro próximo.

Palavras-chave: células estaminais; células estaminais pluripotentes induzidas; medicina regenerativa; terapia celular.

Abstract

Pluripotent stem cells, i.e., embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells (iPSCs) have as their main and distinctive properties the ability to self-renew and capability of differentiate into different cell types. Over time, embryonic stem cells have proven to have the qualities required for scientific research and for the medical field, however, unlike iPSCs, they raise serious ethical issues that limit their application in clinical practice.

The discovery of iPSCs brought the possibility of converting differentiated cells to multipotent stem cells with the ability to originate all cell types through cellular reprogramming techniques. There are numerous applications where these cells can operate, including *in vitro* disease models to study disease mechanisms, drug screening and discovery and regenerative medicine. The iPSCs are a great promise in regenerative medicine, especially in replacement cell therapy. Although, the mechanisms underlying this application aren't yet fully understood and there are still many insufficiently controlled risks to avoid undesired reactions.

In this work is made a review about the application of this technology, focusing mainly on regenerative medicine and the current state of its application in clinical practice, as well as the aspects that needs improvement for safe and effective cell therapy in the near future.

Keywords: stem cells; induced pluripotent stem cells; regenerative medicine; cell therapy

Índice Geral

Índice de Figuras	7
Lista de Abreviaturas.....	9
INTRODUÇÃO.....	11
1. Células estaminais	11
2. Origem e tipos de células estaminais.....	11
2.1. Células estaminais embrionárias	12
2.2. Células estaminais pluripotentes induzidas.....	12
2.3. Células estaminais adultas ou somáticas	14
2.4. Reprogramação celular.....	14
3. Questões éticas e morais.....	18
DESENVOLVIMENTO.....	19
I - As aplicações das células estaminais	19
4. Aplicações das células estaminais pluripotentes induzidas.....	19
5. Utilização das células estaminais na investigação fundamental.....	21
5.1. Modelos de doenças e a descoberta de fármacos	23
II – As células estaminais pluripotentes induzidas na medicina regenerativa.....	27
6. O conceito de medicina regenerativa.....	27
7. Terapia Celular	29
7.1. Ensaios experimentais com células estaminais pluripotentes induzidas.....	31
7.2. Primeiro ensaio clínico com células estaminais pluripotentes induzidas humanas.....	36
8. Principais preocupações e perspectivas futuras na implementação clínica das iPSCs.....	40
CONCLUSÃO.....	45
BIBLIOGRAFIA	47

Índice de Figuras

Figura 1: Processo de obtenção das iPSCs a partir de células adultas	13
Figura 2: Principais avanços científicos que conduziram à obtenção das iPSCs	15
Figura 3: Aplicações médicas das iPSCs.....	20
Figura 4: Vias de sinalização e fatores de transcrição que regulam as características das células estaminais	22
Figura 5: Modelo para a investigação e desenvolvimento de fármacos com base na tecnologia das iPSCs	26
Figura 6: Desenvolvimento da terapia células com base em iPSCs humanas esquematizado	30
Figura 7: Estratégia clínica para a realização de ensaios clínicos com células derivadas iPSCs para aplicação em terapias celulares.....	43

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

CE – Células Estaminais

cGMPs - *current Good Manufacturing Practices*

DMI – Degeneração Macular da Idade

EPR - Epitélio Pigmentar da Retina

iPSC – Células Estaminais Pluripotentes induzidas (*induced Pluripotent Stem Cells*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

RNA – Ácido Ribonucleico

INTRODUÇÃO

1. Células estaminais

As células estaminais (CE) são células indiferenciadas caracterizadas pela sua capacidade de se autorrenovarem indefinidamente num estado indiferenciado durante um longo período de tempo, bem como pelo potencial de se diferenciarem num ou mais tipos de células especializadas. De acordo com estas duas propriedades as CE são identificadas e designadas consoante a sua função ou local de desenvolvimento (por exemplo, CE embrionárias, CE adultas; McCulloch & Till, 2005).

2. Origem e tipos de células estaminais

Durante a gastrulação, a fase principal da embriogénese, ocorre a transformação do blastocisto numa estrutura que compreende as camadas germinativas primárias do embrião (Mora, Serzanti, Consiglio, Memo & Era, 2017) e na qual as células vão perdendo gradualmente o seu potencial de diferenciação.

As únicas células totipotentes são o oócito fecundado – o zigoto – e os blastómeros. Esta totipotência caracteriza-se pela capacidade que as células têm de dar origem a todas as células diferenciadas do organismo. Estas células totipotentes, depois de alguns ciclos de divisão celular, dão origem a uma estrutura oca denominada de blastocisto, que é constituído por uma parede de células externas – trofoblasto – formando uma cavidade – blastocélio – e que, num dos pólos, forma um agregado de células designado de botão embrionário (Bragança, Tavares & Belo, 2010). Estas células vão dar origem ao epiblasto pluripotente, do qual derivam as três camadas germinativas do embrião – ectoderme, mesoderme e endoderme -, que são posteriormente especificadas, rearranjadas e moldadas ao longo do seu desenvolvimento, sendo que o destino de cada uma destas é determinado pela combinação de fatores de transcrição (Mora et al., 2017). São as células pluripotentes do botão embrionário que após a implantação geram as CE embrionárias.

No presente trabalho vão ser consideradas fundamentalmente três tipos de CE: as embrionárias, as pluripotentes induzidas e as adultas ou somáticas.

2.1. Células estaminais embrionárias

Estas células podem ser isoladas a partir do botão embrionário de blastocistos pré-implantados. São consideradas células pluripotentes, já que têm a capacidade de se autorrenovarem, de se diferenciarem em praticamente todos os tipos de células especializadas e, quando injetadas em ratinhos, de formar teratomas, isto é, a forma benigna de teratocarcinoma (Nerem, 2011; Bragança, Tavares & Belo, 2010).

Porém, apesar de possuírem todas estas características favoráveis, são também propensas à formação de tumores no local alvo ou nos tecidos periféricos sob a forma de metástases quando utilizadas em transplantes, isto devido à sua grande capacidade proliferativa e plasticidade (revisto em Mora et al., 2017).

Somente no ano de 1981 se conseguiu pela primeira vez derivar CE embrionárias a partir do botão embrionário de um ratinho (Martin, 1981; Evans & Kaufman, 1981). Após mais de uma década, em 1998, foram geradas as primeiras CE humanas (Thomson et al., 1998). O período de tempo que decorreu entre estes dois importantes acontecimentos foi devido, sobretudo, às diferenças entre as CE do ratinho e as CE humanas e ao facto de terem chegado à conclusão que os meios de cultura usados para as CE do ratinho tinham que ser adaptados de forma a se tornarem adequados para as CE humanas. De modo a ser possível gerar CE humanas a partir do botão embrionário e se conseguirem manter estas células viáveis em cultura, foi necessário começar a recorrer a fatores de crescimento para que as vias de sinalização necessárias à autorrenovação e à proliferação destas células em cultura fossem devidamente ativadas (Yu & Thomson, 2008).

Apesar das diferenças, as CE de ratinho e humanas expressam um conjunto de fatores de transcrição, dos quais se destacam o Nanog, Oct4 e Sox2, que são fundamentais para a repressão da expressão de genes promotores da diferenciação para que estas células mantenham a sua pluripotência (revisto em Tesar et al., 2007).

2.2. Células estaminais pluripotentes induzidas

As células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) são obtidas a partir de células somáticas (células adultas) de diversos tecidos que, através da reprogramação genética, adquirem a capacidade de reverter para um estado de pluripotência similar ao das CE embrionárias, ou seja, conseguem regredir de um estado diferenciado para um

indiferenciado, o que permite que posteriormente tenham a capacidade de se diferenciarem em diferentes tipos celulares (Figura 1; revisto em Nerem, 2011; Aznar & Tudela, 2016).

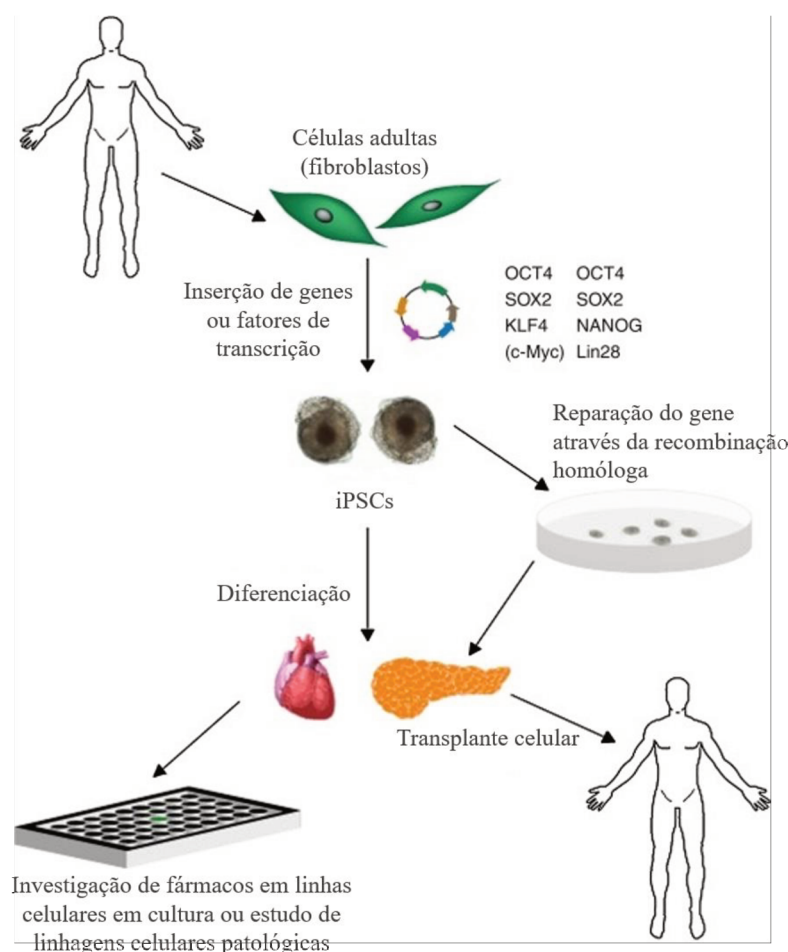


Figura 1: Processo de obtenção das iPSCs a partir de células adultas (adaptado de Aznar & Tudela, 2016)

Com o objetivo de encontrar uma via alternativa para derivar células pluripotentes com as mesmas funções das CE embrionárias, mas que oferecesse um potencial para uso clínico substancialmente maior, Takahashi e Yamanaka fizeram uma pesquisa que resultou na publicação, em 2006, de um trabalho seminal que revelou a possibilidade de induzir a reprogramação de fibroblastos de ratinho em células pluripotentes com propriedades idênticas às das CE embrionárias. Estes investigadores fizeram a reprogramação celular recorrendo à expressão de quatro fatores de transcrição – Oct4, Sox2, Klf4 e C-Myc. Esta descoberta inspirou outros investigadores a atingir uma reprogramação celular bem-sucedida que rapidamente foi aplicada com sucesso nos fibroblastos humanos e, posteriormente, para uma grande variedade de outros tipos de

células. Independentemente do método utilizado para derivar este tipo de células, as iPSC conseguem manter as principais características das CE embrionárias, incluindo a capacidade de se multiplicarem em cultura indefinidamente e de gerar células oriundas de cada uma das três camadas germinativas embrionárias (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; revisto em Robinton & Daley, 2012).

2.3. Células estaminais adultas ou somáticas

De um modo geral, a cada tipo de tecido corresponde um determinado tipo de CE adultas. São grupos de células autorrenováveis que se encontram em tecidos e em órgãos, tanto fetais como adultos, e que têm a capacidade de gerar linhagens específicas de células precursoras originando desta forma células diferenciadas. As CE adultas são muitas das vezes multipotentes e a sua linhagem permite originar células progenitoras unipotentes. Ao longo da vida de um indivíduo as CE adultas mantêm-se em estruturas celulares localizadas nos tecidos ou órgãos, estruturas estas que são designadas de nichos, isto é, são locais específicos de tecidos *in vivo* formados por células diferenciadas que vão modular a atividade das CE (Correia & Bragança, 2010; Tweedell, 2017).

As características destas células são semelhantes às características básicas de todas as CE, ou seja, possuem igualmente a capacidade de se autorrenovarem e de se diferenciarem em alguns tipos de células especializadas, ainda que com menor potencial de diferenciação e de proliferação que as CE embrionárias. As CE adultas possuem um importante papel na reparação e manutenção dos tecidos e órgãos onde estão localizadas, pois quando ocorre qualquer episódio que interfira com o normal funcionamento dos tecidos onde se encontram, estas células servem para corrigir esta anomalia, funcionando como um repositório celular (revisto em Nerem, 2011; Correia & Bragança, 2010).

2.4. Reprogramação celular

As células pluripotentes durante a embriogénese tornam-se limitadas a uma linhagem de células específica de uma forma altamente organizada. O estado diferenciado das células somáticas é considerado bastante estável e, por isso, uma vez diferenciadas, estas células raramente mudam de um estado diferenciado para outro. No entanto, o estado

diferenciado de uma célula somática pode ser revertido experimentalmente para outro tipo celular através do processo de reprogramação celular (revisto em Halley-Stott, Pasque & Gurdon, 2013).

Em 1962, John Gurdon conseguiu obter com sucesso sapos clonados através da substituição do núcleo de um oócito de um sapo por uma célula mais madura proveniente do intestino do animal que posteriormente deu origem a girinos intactos. Deste modo, realizou uma transferência nuclear de células somáticas (figura 2A; Gurdon, 1962). Este importante estudo tinha como objetivo comprovar que não havia perda do material genético durante o desenvolvimento individual e, assim, demonstrou a possibilidade de células epiteliais intestinais serem reprogramadas e passarem novamente para um estado pluripotente, ou seja, que é possível haver uma reversão completa do estado diferenciado das células somáticas (Takahashi & Yamanaka 2013). Posteriormente, no ano de 1987, foi realizada outra descoberta notável por Davis e pelos colegas, onde foi demonstrada a conversão direta de células noutras de fenótipo distinto, através de fatores de transcrição definidos (figura 2B; Davis, Weintraub & Lassar, 1987). Estes métodos da transferência nuclear e da reprogramação direta combinam-se perfeitamente com o conceito de pluripotência induzida (figura 2C) e, por isso, estes dois primeiros métodos foram cruciais para a descoberta da pluripotência induzida (Takahashi & Yamanaka, 2006, 2013).

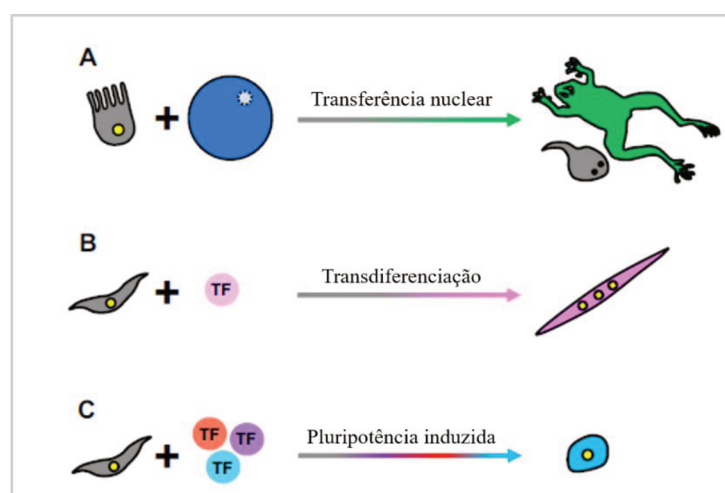


Figura 2: Principais avanços científicos que conduziram à obtenção das iPSCs (adaptado de Takahashi & Yamanaka, 2013)

O processo de reprogramação celular consiste na reversão do ciclo de desenvolvimento de células somáticas (células diferenciadas) para um estado celular diferente (pluripotente), através do uso de processos moleculares (Brandl et al., 2014).

Este processo pode ser realizado de duas formas distintas: pode envolver a reversão de uma célula diferenciada para um estado de maior plasticidade no seu desenvolvimento (“desdiferenciação”) ou pode mudar a célula de um tipo celular diferenciado para outro de uma forma direta (transdiferenciação ou reprogramação direta; Halley-Stott et al., 2013).

A identidade de qualquer célula é determinada pela expressão de genes característicos da linhagem a que pertence, isto é, pelo seu fenótipo. Um determinado conjunto de fatores de transcrição, designados de fatores de reprogramação, provocam alterações no estado epigenético das células, causando alterações na sua expressão genética, o que as obriga a ativar novos genes específicos da linhagem e desativar os antigos (Halley-Stott et al., 2013; Takahashi & Yamanaka, 2013). Assim, é essencial que durante a reprogramação de células somáticas haja uma redefinição dos mecanismos epigenéticos que permitem que a expressão de genes se mantenha estável (Halley-Stott et al., 2013). No entanto, as iPSCs humanas podem ser reprogramadas epigeneticamente sem que haja necessariamente uma rutura de toda a sua integridade genómica (Brandl et al., 2014).

A descoberta dos fatores de transcrição com maior importância no desenvolvimento celular e para a sua pluripotência foi fundamental para o desenvolvimento das técnicas de reprogramação. Estes fatores são proteínas que se ligam ao ADN e que são essenciais para induzir mudanças globais na atividade de genes relevantes no desenvolvimento da célula (Brandl et al., 2014). Deste modo, um dos objetivos do processo de reprogramação é estimular os fatores de transcrição endógenos que caracterizam uma célula pluripotente. A tecnologia das iPSCs foi descoberta partindo da reprogramação direta através da expressão forçada de fatores de transcrição específicos - Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc. Estes são os fatores de transcrição que revelam maior importância e que, quando combinados, o processo de reprogramação aparenta ser mais eficiente (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007).

No processo de derivação de iPSCs inicialmente recorria-se ao uso de retrovírus e/ou de lentivírus para a transdução de genes reguladores de forma separada ou num único vetor de expressão. Contudo, o uso de vírus com a capacidade de se integrar nos cromossomas do hospedeiro acarreta o risco de mutagénese e transformações potencialmente malignas, o que os torna inadequadas para serem utilizados em estudos

clínicos. Além disso, a presença de vírus pode desencadear uma resposta imunitária. Assim, foram continuamente estudados e desenvolvidos novos métodos para gerar iPSCs. Técnicas que envolvem plasmídeos, RNAs sintetizados e proteínas foram utilizadas para induzir o estado pluripotente de diversos tipos de células somáticas e todas estas técnicas indicam ser mais toleráveis em estudos clínicos quando comparadas com a transdução viral. Apesar da tecnologia de reprogramação utilizada, a ameaça de estas células se tornarem imprevisíveis e induzirem danos genéticos e darem origem ao crescimento de células malignas, está sempre presente (Hirschi, Li & Roy, 2014; Turinetto, Orlando & Giachino, 2017).

A reprogramação constitui uma técnica de elevado interesse por diversas razões, das quais se destacam: o facto de permitir a compreensão de como a diferenciação celular e a expressão de genes especializados são mantidos; pelo potencial contributo que poderá ter na terapia de regeneração, onde as células e tecidos defeituosos serão substituídos por outros normais; e por proporcionar o estudo da natureza das doenças e a descoberta de novos fármacos (Halley-Stott et al., 2013).

3. Questões éticas e morais

As células estaminais, pelas suas principais características de autorrenovação e de diferenciação, têm tido um importante contributo nas áreas da medicina e investigação. Este contributo manifesta-se sobretudo por serem consideradas uma fonte de células ou tecidos para terapias regenerativas, terapias génicas e por possibilitarem o estudo dos mecanismos de doenças e a descoberta de novos fármacos.

Para a aplicação das CE no tratamento de doenças humanas é fundamental que sejam compreendidos os complexos mecanismos biológicos envolvidos. As CE precisam de ser isoladas e mantidas em cultura num estado indiferenciado, para que possam ser manipuladas laboratorialmente de modo a induzir a sua diferenciação no tipo celular pretendido e, posteriormente, utilizadas para regenerar tecidos danificados. No entanto, uma das maiores preocupações relativamente a esta utilização é a possibilidade de ocorrer o desenvolvimento de doenças secundárias, como por exemplo, o desenvolvimento de tumores a partir das células inoculadas (Aznar & Tudela, 2016; Brandl et al., 2014).

Um das fontes de CE mais promissoras clinicamente são as CE embrionárias, tendo-se também revelado uma importante ferramenta no estudo e na compreensão do desenvolvimento humano e da organogénese (Kolios & Moodley, 2013). Contudo, este tipo de CE suscitam algumas questões éticas e morais relacionadas sobretudo com a sua forma de obtenção, nomeadamente quando implica a destruição de embriões. Esta preocupação tem levado os investigadores a desenvolverem métodos alternativos que permitam obter CE para a derivação de linhas celulares através de procedimentos técnicos que não impliquem a morte do embrião (Miguel-Beriain, 2014).

Face às CE embrionárias, as iPSCs, dentro dos vários tipos de CE existentes, permitem ultrapassar este tipo de questões éticas relacionadas com o modo como são obtidas e manipuladas. Outro aspeto importante relativamente a estas CE reprogramadas é o facto de também gerarem menos preocupações quanto ao perigo da rejeição alogénica quando utilizadas em determinadas terapêuticas. Desta forma, as iPSCs são CE com um potencial enorme e têm a vantagem de suscitarem menos problemas éticos e morais (Aznar & Tudela, 2016; Rawat & Singh, 2017).

DESENVOLVIMENTO

I - As aplicações das células estaminais

4. Aplicações das células estaminais pluripotentes induzidas

As iPSCs pelas suas propriedades surgiram como uma alternativa que veio a substituir cada vez mais as CE embrionárias nas áreas das ciências biomédicas e investigação. Estas células possuem um potencial enorme para serem utilizadas tanto na área da investigação médica como para desenvolverem aplicações clínicas, e o facto de conseguirem ultrapassar algumas barreiras éticas facilita a sua utilização nestas áreas (Rawat & Singh, 2017).

Um dos objetivos do uso deste tipo de CE consiste em obter um tipo celular relevante correspondente a uma determinada doença que possibilite o estudo *in vitro* dos seus mecanismos fisiopatológicos, ao invés de o fazer através da realização de biópsias, e também que haja crescimento de culturas de tipos celulares diferenciados a partir destas. A capacidade de conseguir derivar células de vários tecidos a partir das iPSCs que permitam o estudo mais aprofundado da patogénese e do tratamento de diversas doenças é outro dos objetivos do uso destas células (Aznar & Tudela, 2016).

São diversas as áreas onde as iPSCs podem ser utilizadas, mas as suas aplicações concentram-se sobretudo na investigação das CE no âmbito das ciências básicas, nos modelos de doenças, na descoberta de fármacos, em tratamentos de infertilidade e na medicina regenerativa. Já foram realizadas algumas aplicações práticas também no âmbito da investigação animal, como a criação de animais transgénicos entre outras (Rawat & Singh, 2017).

Apesar de todos os desafios, hoje em dia uma rotina importante nesta área é a derivação de iPSCs específicas do doente e da doença através da reprogramação celular. Em suma, este tipo de iPSCs específicas fornecem informações a partir das quais se pode obter uma visão dos mecanismos de diversas doenças, permitem testar fármacos *in vitro* com o fim de avaliar o seu potencial terapêutico, bem como explorar a reparação de genes juntamente com a terapia celular de substituição. No exemplo da figura 3 estão representadas as aplicações médicas referidas, onde o doente tem uma doença neurodegenerativa e as iPSCs específicas do doente podem ser utilizadas em duas vias

alternativas. Nos casos em que a mutação causadora da doença é conhecida, a edição de genes poderia ser utilizada para corrigir a sequência de ADN (via representada do lado direito). Neste caso as iPSCs específicas do doente com a correção do gene feita passariam por uma diferenciação direcionada para o subtipo neuronal afetado e seriam posteriormente transplantadas para o cérebro do doente. Em alternativa, poderia ser induzida uma diferenciação das iPSCs específicas do doente para o subtipo neuronal afetado, o que iria permitir que a doença fosse modelada *in vitro* e potenciais fármacos poderiam ser avaliados, ajudando na descoberta de novas terapêuticas (via representada do lado esquerdo; Robinton & Daley, 2012).

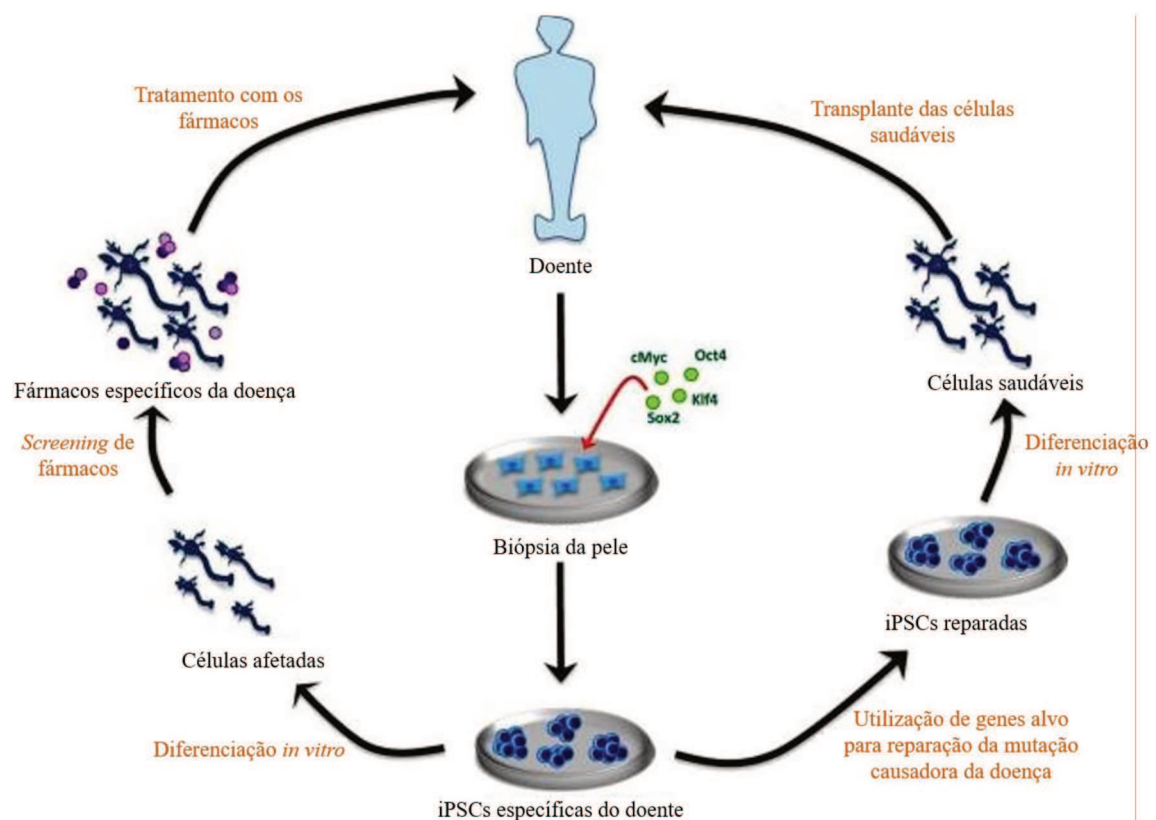


Figura 3: Aplicações médicas das iPSCs (adaptado de Robinton & Daley, 2012)

5. Utilização das células estaminais na investigação fundamental

Células que são cultivadas *in vitro* têm a tendência de acumular anomalias cromossômicas ao longo das passagens devido à ausência de pressão seletiva. As células reprogramadas demonstram uma predisposição ainda maior para anomalias cromossômicas devido a uma forte remodelação epigenética associada ao próprio processo de reprogramação (Laurent et al., 2011). A reprogramação das células para um estado pluripotente implica que sejam feitas mudanças epigenéticas, em que algumas destas são necessárias para que a reprogramação ocorra e outras são introduzidas inadvertidamente durante o processo (Robinton & Daley, 2012).

No caso das células reprogramadas, isto é, das iPSCs verificou-se que existia um ponto de acumulação de mutações, principalmente nas vias oncogénicas (Robinton & Daley, 2012). De acordo com um estudo realizado por Laurent e pelos colegas, os resultados sugerem que a reprogramação possa estar associada às diversas deleções verificadas em genes supressores de tumores e que o longo período de tempo em que as células se encontram em cultura possa levar às duplicações de oncogenes em iPSCs humanas (Laurent et al, 2011).

As vias de sinalização são outro fator crucial a ter em conta nas técnicas de reprogramação, dado que as diferenças na expressão de genes que controlam estas vias são suscetíveis a alterar o comportamento celular e o potencial de diferenciação *in vitro* (Ortmann & Vallier, 2017). Os estímulos extrínsecos e os circuitos intrínsecos desempenham um papel sinérgico na manutenção do estado indiferenciado e de autorrenovação das células. Nas células estaminais murinas, os principais fatores envolvidos na manutenção da pluripotência são o LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), os TGFs (*Transforming Growth Factors*) e os FGFs (*Fibroblast Growth Factors*). O LIF é um fator chave na manutenção da pluripotência dado que inibe a diferenciação celular. Quando este fator se liga ao recetor, as vias JAK-STAT são ativadas e vai haver uma regulação na expressão de genes no sentido de manter a célula no estado pluripotente (Figura 4; Ortmann & Vallier, 2017; Rawat & Singh, 2017). No caso das células humanas, a via de sinalização do LIF tem muito pouca expressão ou quase nenhuma na manutenção da pluripotência (Yu & Thomson, 2008).

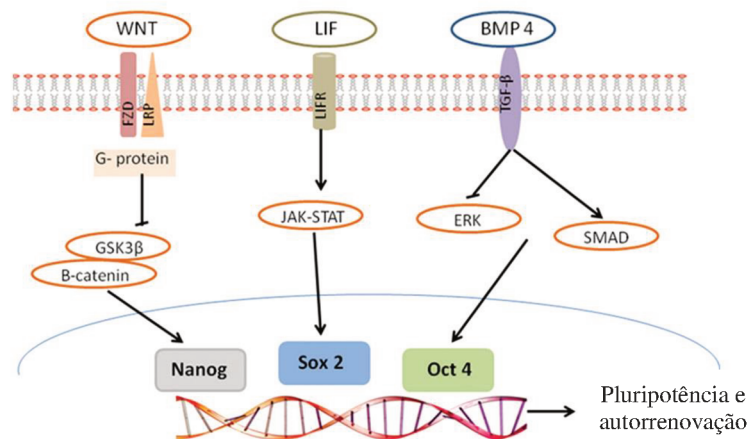


Figura 4: Vias de sinalização e fatores de transcrição que regulam as características das células estaminais (adaptado de Rawat & Singh, 2017)

Os componentes da via de sinalização BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), que pertence à superfamília dos TGFs- β , encontram-se presentes nas CE embrionárias humanas (Yu & Thomson, 2008). O conjunto de fatores que pertencem aos TGFs- β estão também envolvidos em vias que são cruciais na manutenção da pluripotência e no destino das CE embrionárias. Relativamente aos FGFs, a sua sinalização tem também um papel determinante na manutenção da pluripotências das CE embrionárias, pois a eliminação destes fatores ou a interferência na sua via de sinalização por inibidores dos recetores de FGF vai provocar a diferenciação celular. A sinalização dos FGFs inicia-se pela ligação aos recetores destes fatores que vão desencadear diversas cascatas de sinalização.

A via de sinalização dos TGFs- β é o primeiro alvo dos fatores de reprogramação, em que determinados membros da família dos TGFs- β são reprimidos ou suprimidos pelos Oct4, Klf4, c-Myc e Sox2 de acordo com a função de cada um. Assim, para a reprogramação de células de fibroblastos para um estado pluripotente, existe uma distribuição particular de tarefas entre os fatores de transcrição de modo a intervir em determinadas vias de sinalização (Rawat & Singh, 2017).

A outra via de sinalização representada na figura 4 é a Wnt. Esta é uma via que se caracteriza pela regulação de aspetos cruciais a nível celular, como a diferenciação, a migração e a polaridade celular, e a organogénese durante o desenvolvimento embrionário. O processo é desencadeado pela ligação das proteínas Wnt aos recetores acoplados à proteína-G que vai provocar a estabilização da β -catenina (através da inibição

da GSK3 β) e a sua entrada no núcleo, ativando desta forma os fatores de transcrição associados à pluripotência e à renovação celular. Esta via está portanto implicada na renovação das CE embrionárias (Komiya & Habas, 2008).

Assim sendo, foram surgindo ao longo do tempo diferentes técnicas de reprogramação que permitiram resolver alguns problemas relacionados com os fatores de transcrição e as vias de sinalização que controlam a pluripotência celular. A metodologia atual de reprogramação celular permite articular e gerir o risco de se atuar sobre os fatores de transcrição que regulam o estado epigenético das células e que podem levar a uma alteração na expressão dos seus genes.

A aplicação das iPSCs na investigação fundamental ajuda a ampliar conhecimentos em determinadas áreas, sobretudo sobre o processo da embriogénese, da gastrulação e diferenciação das CE em diversos tipos de tecidos. Na área de investigação sobre o cancro, as técnicas de reprogramação surgiram como uma ferramenta muito importante e versátil no estudo de mecanismos de modelação do processo de tumorigénese humano. As iPSCs derivadas de um doente em particular podem possibilitar um melhor entendimento sobre os nichos a partir dos quais ocorre a progressão do cancro e a construção de modelos de doença mais adequados. Além disto, as iPSCs que são geradas a partir de células cancerígenas podem ser utilizadas como modelo para gerar linhas celulares, com o objetivo de se perceber melhor os mecanismos moleculares envolvidos que participam na iniciação e progressão do cancro e para se conseguir ultrapassá-los (Rawat & Singh, 2017).

5.1. Modelos de doenças e a descoberta de fármacos

No decorrer dos tempos, os estudos no âmbito dos modelos de doenças eram realizados sobretudo em modelos animais geneticamente modificados, principalmente em ratinhos. No entanto, utilizar o modelo animal como modelo de doença apresenta a desvantagem de na maioria dos casos não demonstrar com precisão todos os sintomas da doença humana. Deste modo, com o avanço da tecnologia na área das iPSCs surgiu a possibilidade de começar a utilizar estas células para construir modelos de doenças *in vitro*. São utilizadas nomeadamente iPSCs específicas do doente, pois estas além de

possuírem a capacidade de se diferenciarem em qualquer tipo celular, que de outra forma seria bastante difícil de obter, possuem ainda a vantagem de transportar consigo a mutação que caracteriza a doença e toda a informação genética do doente. Assim, os tipos de células afetadas pela doença diferenciadas a partir das iPSCs derivadas do doente têm a capacidade de reproduzir os fenótipos da doença *in vitro*. Contudo, um dos maiores desafios nesta área é a identificação dos fenótipos associados à doença e a capacidade de modelar a patogénese e o tratamento da doença nas iPSCs (Mora et al., 2017; Rawat & Singh, 2017; Kondo, Toyoda, Inagaki & Osafune, 2017; Lee et al., 2009).

Neste âmbito, as iPSC são fundamentais para ajudar a compreender a patogénese das doenças, identificar novos alvos terapêuticos e para aumentar a probabilidade do sucesso clínico de novas moléculas com potencial farmacológico que podem ser testadas nos modelos de doença (Grskovic, Javaherian, Strulovici & Daley, 2011).

As aplicações das iPSCs na investigação dos mecanismos de doenças e de potenciais fármacos para o tratamento destas destinam-se a abranger inúmeras doenças sendo que já foram derivadas diversas iPSCs, nomeadamente das linhas celulares hematopoiética, hepática, endotelial, neurológica e cardiovascular (Rawat & Singh, 2017).

Na área cardiovascular, uma das doenças que deu origem a mais modelos de doença foi a síndrome do QT longo. Trata-se de uma doença congénita com 12 tipos diferentes, em que cada um deles está associado a um funcionamento anormal do canal iónico que provoca uma repolarização ventricular prolongada que dá origem a um intervalo QT prolongado visível num eletrocardiograma. Apesar do grande número de estudos realizados nesta área com o objetivo de desvendar os mecanismos subjacentes a esta síndrome, subsistia uma lacuna quanto à capacidade de criar modelos específicos do doente que representassem as variações da doença e ao nível das fontes *in vitro* de cardiomiócitos humanos, dado que estes apresentam propriedades eletrofisiológicas complexas que diferem entre espécies. De modo a preencher esta lacuna, Moretti e os colegas aplicaram as tecnologias das iPSCs ao diferenciarem estas células de doentes com a síndrome do QT longo de tipo 1 em cardiomiócitos, sendo esta a primeira doença cardíaca a ser modelada com iPSCs humanas. Com a ajuda deste modelo de doença, os investigadores confirmaram o mecanismo subjacente à doença e, para além disso, ainda testaram compostos que a exacerbam e chegaram à conclusão que a utilização de bloqueadores dos recetores β -adrenérgicos atenua a expressão do fenótipo do QT longo

(Robinton & Daley, 2012; Mora et al., 2017; Moretti, 2010). Entretanto, têm sido concretizados mais estudos neste sentido e o recente desenvolvimento de iPSCs de cardiomiócitos permitiu que os fenótipos desta doença cardiovascular humana fossem modelados, que fossem testados possíveis fármacos e que desenvolvessem novas abordagens terapêuticas (Karakikes, Ameen, Termglinchan & Wu, 2015).

A disautonomia familiar, doença genética rara do sistema nervoso periférico, é outro exemplo de doença para a qual foi concebido um modelo bem sucedido a partir de iPSCs de doentes. O que se conhecia da doença era que esta era provocada por uma mutação no gene *IKBKAP8* e que ocorria uma depleção dos neurónios sensoriais, no entanto o mecanismo que está na origem da perda destes neurónios não era bem conhecido, o que levou à necessidade de conceber um modelo de doença. Sendo assim, Lee e os colegas derivaram as iPSCs específicas dos doentes com esta patologia, que posteriormente foram diferenciados em precursores dos neurónios afetados pela doença, conseguindo-se reproduzir *in vitro* os fenótipos associados a esta. Com este estudo concluíram que o modelo de doença criado apresentava um grande potencial para compreender a patogénese da doença *in vitro* e que um maior número de linhagens de iPSCs com a mutação da disautonomia familiar talvez pudesse vir a ser útil para validar o fenótipo associado (Lee et al., 2009; Robinton & Daley, 2012).

Para além disto, outra potencial aplicação das iPSCs humanas é o uso de células específicas do doente para descobrir novos fármacos. De modo a implementar a tecnologia das iPSCs nesta área é fundamental cumprir alguns aspetos dos quais se destacam: derivar iPSCs de elevada qualidade e armazená-las num bio-banco que permita o seu rastreamento e a recuperação de amostras; a diferenciação das iPSCs derivadas do doente em tipos celulares chave que são afetados pela doença em estudo, e descobrir o fenótipo da mesma. Na figura 5 está esquematizado um exemplo de modelo destinado à descoberta de fármacos. Este processo inicia-se com as amostras retiradas do doente para dar origem a iPSCs e em seguida faz-se a diferenciação direta destas em células que são relevantes para a doença. Esta tecnologia permite reproduzir a doença *in vitro*, sendo daqui que surge o termo “*disease in a dish*”, o que torna possível fazer a pesquisa de fármacos. É desta forma que é possível utilizar esta tecnologia para descobrir fármacos apropriados para a patologia em estudo. No diagrama está representado o processo de produção de iPSCs que se inicia a partir do doente, numa fase seguinte as iPSCs são

derivadas e posteriormente é feita uma caracterização das células e são armazenadas num bio-banco (Grskovic et al., 2011).

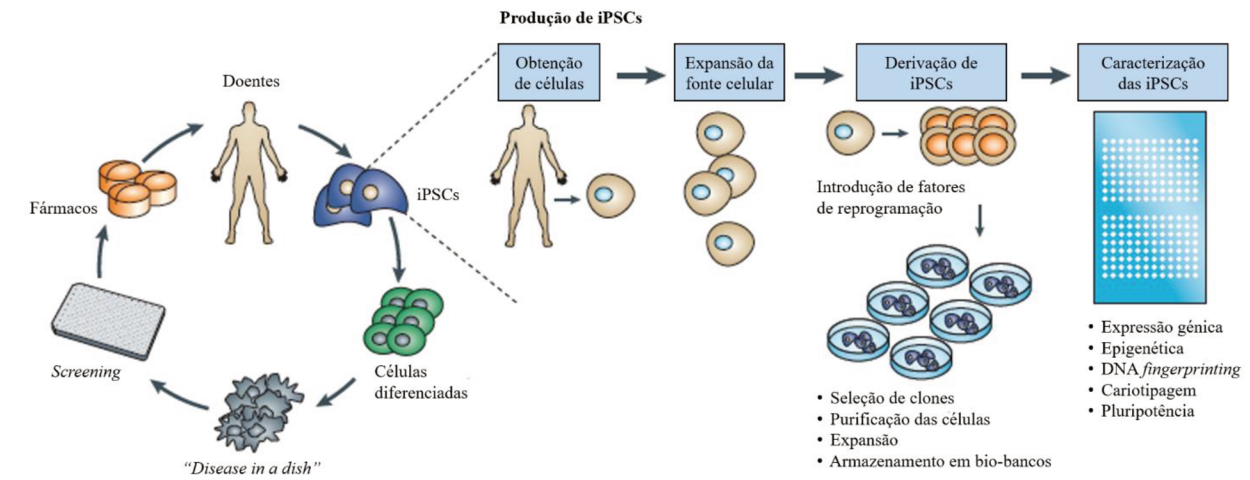


Figura 5: Modelo para a investigação e desenvolvimento de fármacos com base na tecnologia das iPSCs (adaptado de Grskovic et al., 2011)

No estudo de Lee e dos colegas referido anteriormente, os investigadores conceberam com sucesso um modelo de doença para a disautonomia familiar que permitia explorar e compreender com precisão a patogénese desta doença. Por esta razão aprofundaram o seu estudo e decidiram aproveitar o modelo concebido para fazerem *screening* de algumas moléculas, no decurso do qual os investigadores demonstraram que o fenótipo da doença podia ser parcialmente normalizado pela cinetina, uma hormona vegetal. Este é um exemplo de como as iPSCs podem facilitar a descoberta de novas opções terapêuticas (Lee et al., 2009).

Em suma, o uso das iPSCs permite que a área dos modelos de doenças humanas seja explorado, o que ajuda a compreender melhor os mecanismos patogénicos das doenças que, consequentemente, possibilita a melhoria das terapêuticas celulares para doenças degenerativas (Kolios & Moodley, 2013). Patologias como as doenças de Parkinson ou de Alzheimer, cujos mecanismos subjacentes ainda não são bem compreendidos, são também um desafio importante desta área pois é importante que sejam desenvolvidos modelos para este tipo de doenças para que posteriormente se consigam estudar opções terapêuticas apropriadas (Grskovic et al., 2011; Beevers, Caffrey & Wade-martins, 2013).

II – As células estaminais pluripotentes induzidas na medicina regenerativa

6. O conceito de medicina regenerativa

A medicina regenerativa e a engenharia dos tecidos são duas grandes áreas que se complementam e se focam sobretudo no estudo de técnicas e estratégias que permitam reparar um tecido ou órgão, ou até mesmo substituí-lo. Frequentemente o termo “medicina regenerativa” é utilizado como sinónimo de engenharia dos tecidos. No entanto, a principal diferença entre estas duas áreas reside no facto de a medicina regenerativa utilizar exclusivamente como fonte celular as CE, sobretudo CE humanas, podendo recorrer a CE adultas, embrionárias ou a iPSC, por exemplo. As iPSC são as que, em termos éticos e morais, suscitam menos problemas e, como são obtidas por reprogramação celular, também apresentam menos limitações relativamente à forma como são obtidas. Isto porque no caso das CE adultas, por exemplo, a sua identificação é mais difícil bem como o seu isolamento a partir dos tecidos e órgãos de interesse (Berthiaume, Maguire, & Yarmush, 2011; Mason & Dunnill, 2008).

Nos seres humanos a regeneração está naturalmente presente em alguns tecidos, como é o caso do fígado, ou manifesta-se de forma distinta como quando ocorre a substituição normal de células como por exemplo na mucosa intestinal ou na epiderme. Sendo que este fenómeno não acontece da mesma forma em todos os tecidos, a medicina regenerativa surge com o objetivo de substituir ou regenerar células humanas, tecidos ou órgãos de modo a reparar ou restabelecer o seu normal funcionamento sobretudo pelo fornecimento de células, particularmente as CE que tenham a capacidade de estimular uma regeneração mais ampla (Jain & Bansal, 2015; Mason & Dunnill, 2008).

Neste âmbito, começou a surgir interesse no estudo da aplicação da medicina regenerativa sobretudo na área da transplantação de órgãos e tecidos. Para isso, começaram a ser utilizadas combinações de diversas abordagens tecnológicas que permitem ir além das terapias tradicionais de transplantes e substituição (Jain & Bansal, 2015). A medicina regenerativa constitui uma área interdisciplinar que aplica sobretudo princípios de engenharia dos tecidos, de biologia celular e de biomateriais de modo a promover a regeneração celular (Mao & Mooney, 2015). O transplante celular ou a terapia celular e a geração de órgãos recorrendo a CE de um tecido adulto são exemplos de tecnologias utilizadas nesta área (Jain & Bansal, 2015). Outras aplicações de interesse da

medicina regenerativa são o uso para a investigação de novos fármacos e para realizar estudos toxicológicos (Mason & Dunnill, 2008).

7. Terapia Celular

A atual terapia de transplantes de órgãos e tecidos tem limitações associadas à falta de órgãos disponíveis para transplante e à necessidade de o doente ter que fazer fármacos imunossupressores para toda a vida, o que ainda assim não impede completamente a ocorrência de complicações imunológicas frequentemente presentes nesta terapia. Estes obstáculos podem ser ultrapassados através do uso de estratégias da medicina regenerativa (Mao & Mooney, 2015).

A perda de órgãos e tecidos, bem como o surgimento de lesões devido a doenças, motivam o desenvolvimento de terapias com a capacidade de regenerar tecidos e que diminuam a dependência de transplantes (Mao & Mooney, 2015). Deste modo, as iPSCs constituem uma promessa enorme para a medicina regenerativa, nomeadamente no âmbito da substituição de células doentes ou danificadas em órgãos-alvo. A conceção de iPSCs específicas de doentes tem sido motivada pela possibilidade de obter células e tecidos imuno-compatíveis para transplantes autólogos, uma vez que a eficácia do tratamento é influenciada pelas complexas interações entre o dador e o hospedeiro, o que diminui significativamente com o uso de iPSCs específicas do doente. (Robinton & Daley, 2012; Arjmand, Goodarzi, Mohamadi-jahani, Falahzadeh & Larijani, 2017).

De um modo geral, a abordagem para o desenvolvimento de terapias celulares com base em iPSCs humanas pode ser dividida em 6 etapas: inicialmente as células somáticas são extraídas de doentes afetados pela doença em estudo e colocadas em cultura; estas células somáticas do doente são reprogramadas e dão origem às iPSCs; as iPSCs derivadas do doente são corrigidas a nível genético; é induzida a diferenciação das iPSCs geneticamente corrigidas para o tipo celular pretendido com o fim de se obterem células doadoras saudáveis com o genoma adequado; estas células posteriormente são submetidas a testes de controlo de qualidade que incluem testes de identificação celular, de avaliação do nível de pureza, de atividade e de segurança; e por fim, as células geneticamente adaptadas ao doente e cujos testes de controlo de qualidade foram aceitáveis, são transplantadas para o doente para terapia celular (Figura 6; Yoshida & Yamanaka, 2017).

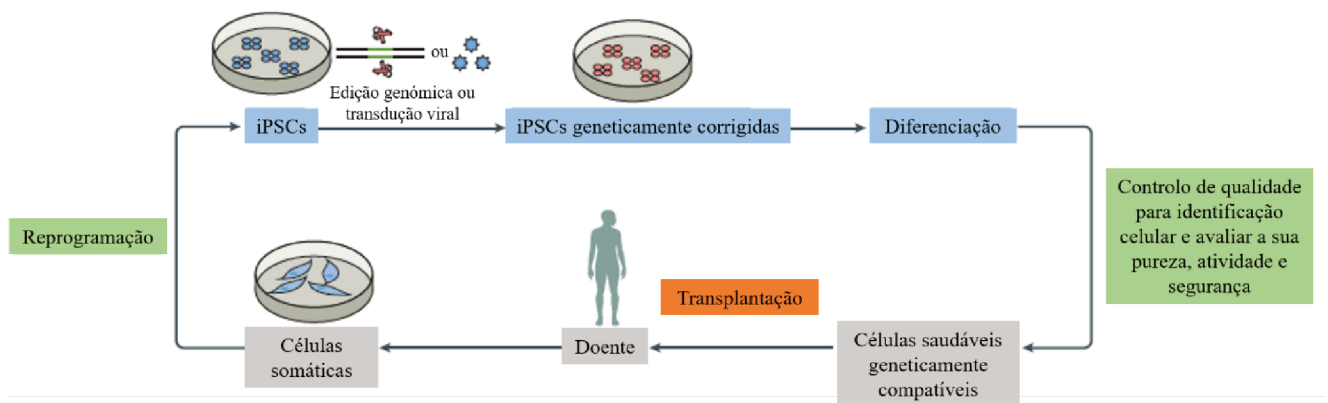


Figura 6: Desenvolvimento da terapia células com base em iPSCs humanas esquematizado (adaptado de Yoshida & Yamanaka, 2017)

A capacidade de fornecer iPSCs em número suficiente ou células progenitoras derivadas destas para utilizar em terapias para os tecidos alvos, mantendo uma viabilidade e funcionalidade altas são fatores chave para que este tipo de células seja aplicado na prática clínica (Hirschi et al., 2014).

Na terapia celular, a distribuição para os órgãos ou tecidos alvo das iPSCs ou das células que derivam destas pode ser feita de duas formas distintas: por injeção intravenosa das células com a expectativa de que posteriormente as células migrem em direção ao órgão ou tecido alvo, ou por administração local das células através de um cateter implantado ou por cirurgia aberta (Hirschi et al., 2014). Para a administração local, têm sido utilizados sobretudo *scaffolds* constituídos por biomateriais para implantação ou injetáveis, nomeadamente na área das células cardíacas (Lu et al., 2013; Kawamura et al., 2012; Kawamura et al., 2013). No caso de procedimentos por injeção intravenosa, normalmente as células são injetadas num *buffer*, isto é, numa solução que resiste às mudanças de pH, sem terem sido adicionados veículos celulares. No entanto, este tipo de abordagem normalmente leva a uma elevada percentagem de morte celular. Assim sendo, os procedimentos que permitem a administração local das células permite que as células atinjam o local pretendido e podem proporcionar uma melhoria considerável do enxerto realizado. É fundamental que os meios utilizados permitam a sobrevivência e a proliferação celular, o que se verifica especialmente quando são utilizados *scaffolds*, o que lhes dá a capacidade de fornecer células em número suficiente ao tecido ou órgão alvo, levando a enxertos eficientes (Hirschi et al., 2014).

Este tipo de terapias pode recorrer ao uso de iPSCs autólogas ou alogénicas. Quando se utilizam iPSCs autólogas, isto é, do próprio doente, o risco de rejeição imunológica diminui significativamente, assim como o risco de transmissão de vírus ou outras formas de infeção. No entanto, o desenvolvimento de iPSCs específicas do doente está associado a custos médicos elevados. Por esta razão, a utilização de iPSCs alogénicas na medicina regenerativa deve ser considerada como uma opção viável, até porque uma das maiores vantagens da tecnologia das iPSCs é a diversidade existente de candidatos a doadores de células. Neste contexto, antes de se derivarem iPSCs para uso a nível clínico, é fundamental que todos os aspetos relevantes dos doadores sejam cuidadosamente examinados, como as suas condições de saúde e o tipo de antígeno leucocitário humano (HLA) que é expresso, por exemplo. Este tipo de análise permite ainda compreender se variações genéticas que surgem nas iPSCs clonadas já existiam no doador ou se foram adquiridas durante o processo de reprogramação celular (Takahashi & Yamanaka, 2013).

A tecnologia das iPSCs pode ser amplamente conjugada com a terapia celular, sendo que uma das características que a distingue mais é o fato de ter uma diversidade enorme de fontes celulares. As iPSCs humanas idealmente devem ser obtidas através de procedimentos pouco invasivos e que estejam associados ao menor risco possível e, é por este princípio que a maioria das iPSCs utilizadas em estudos publicados são derivadas a partir de células da pele (Takahashi & Yamanaka, 2013).

Para que se consiga atingir o grande potencial da terapia celular na medicina regenerativa, é essencial que seja determinada com precisão a informação do perfil de cada doente e que as estratégias de terapêuticas celulares estejam de acordo com as características particulares de cada indivíduo (Arjmand et al., 2017).

7.1. Ensaios experimentais com células estaminais pluripotentes induzidas

O primeiro ensaio experimental neste âmbito foi realizado em 2007 por Hanna et al., e veio demonstrar a aplicabilidade das iPSCs na medicina regenerativa (Hanna et al., 2007). Este ensaio tinha como objetivo o tratamento da anemia falciforme – uma doença causada por um defeito de um único gene -, recorrendo ao uso de iPSCs. Foram derivadas iPSCs de um ratinho, nas quais o alelo da hemoglobina mutada foi corrigido através da segmentação específica do gene. Posteriormente as iPSCs foram diferenciadas em progenitores hematopoiéticos e, por fim, transplantadas para um ratinho anémico. No

decorrer deste ensaio verificou-se que esta estratégia corrigiu o fenótipo das células sanguíneas e que, portanto, a doença foi curada (Hanna et al., 2007; Lu & Zhao, 2013; Rawat & Singh, 2017).

Trabalhos mais recentes têm colocado a área das células estaminais cada vez mais perto do desenvolvimento de estratégias para gerar células que de outra forma seriam difíceis de obter, como neurónios e cardiomiócitos. Ao longo do tempo têm sido publicados inúmeros estudos que sugerem que produtos celulares derivados de iPSCs humanas podem ser utilizados no tratamento de patologias como a insuficiência cardíaca, a diabetes, degeneração da retina, doenças neurodegenerativas, entre outras. Muitos estudos pré-clínicos demonstram o potencial das células derivadas de iPSCs como uma nova fonte para a terapia celular de substituição (Kawamura et al., 2012; Kawamura et al., 2013; Kondo et al., 2017; Payne et al., 2014).

A insuficiência cardíaca é uma das causas de morte mais comuns em todo o mundo, e o tratamento médico para doentes com insuficiência cardíaca grave continua a ter um benefício limitado. Métodos cirúrgicos, como o transplante, são uma opção limitada a um reduzido número de doentes dada a escassez de órgãos disponíveis para transplante (Yoshida & Yamanaka, 2017). Por estas razões, no decorrer dos anos, o tratamento da doença cardíaca requeria o desenvolvimento de estratégias terapêuticas novas e personalizadas e foi neste sentido que Lu e os colegas realizaram o seu estudo em 2013. Neste estudo transplantaram para ratinhos células progenitoras cardiovasculares multipotentes derivadas a partir de iPSCs humanas. Foi a primeira vez que foram utilizadas células progenitoras cardiovasculares humanas na área da engenharia de tecidos cardíacos. Ao longo do estudo verificaram que as células transplantadas tiveram a capacidade de migrar, proliferar e de se diferenciar *in situ* em cardiomiócitos, em células do músculo liso e células endoteliais com grande eficiência para reconstruir o coração danificado. Os investigadores verificaram ainda que os tecidos cardíacos concebidos a partir das células utilizadas apresentaram contrações espontâneas, a capacidade de gerar força mecânica e que se mostraram responsivos a fármacos. Uma das principais características deste estudo que o destaca relativamente aos restantes dentro desta área é o facto de terem utilizado cardiomiócitos derivados a partir de iPSCs humanas, dado que a maioria dos tecidos cardíacos eram concebidos com cardiomiócitos murinos. Quando comparados com os cardiomiócitos isolados diretamente dos doentes, os cardiomiócitos

derivados de iPSCs humanas possuem as vantagens de serem autorrenováveis e de não obrigarem a um tratamento farmacológico prolongado (Lu & Zhao, 2013; Lu et al., 2013).

O transplante de cardiomiócitos derivados a partir de iPSCs humanas demonstrou ser promissor na formação de um novo miocárdio funcional *in situ*, no entanto a sobrevivência e a funcionalidade das células transplantadas são críticas a longo prazo. Deste modo, foi estudada a eficácia terapêutica do transplante de cardiomiócitos derivados de iPSCs humanas num modelo suíno com cardiomiopatia isquêmica crônica e verificou-se que as células transplantadas raramente sobrevivem no coração num longo período de tempo possivelmente devido ao suporte insuficiente da rede vascular do tecido nativo (Kawamura et al., 2012). Após um ano, foi descrito o transplante de células compostas por cardiomiócitos derivados de iPSCs humanas recorrendo novamente a um modelo animal suíno de enfarte do miocárdio, onde foi realizado um transplante intramiocardial com estas células juntamente com células do omento (células do peritoneu). Os investigadores verificaram que a combinação de cardiomiócitos derivados de iPSCs humanas com as células do omento permite prevenir a isquemia das células depois do transplante, dado que promove a angiogénese, o que leva ao aumento da sobrevivência das células transplantadas. Apesar dos estudos promissores realizados ao longo do tempo, é necessária mais investigação para que sejam alcançadas estratégias clinicamente relevantes para aumentar as possibilidades de se recorrer aos transplantes de cardiomiócitos derivados de iPSCs humanas no tratamento da insuficiência cardíaca (Kawamura et al., 2013; Yoshida & Yamanaka, 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a diabetes mellitus do tipo 1 é uma doença crónica caracterizada pela destruição das células β do pâncreas e que resulta num défice de insulina produzida por este órgão. Tendo em conta os problemas associados aos atuais tratamentos para esta doença, tornou-se importante o desenvolvimento de novas abordagens, bem como encontrar novas fontes de células β pancreáticas humanas. A produção destas células a partir de iPSCs pode ser uma alternativa e, para demonstrar isso mesmo, tem sido examinada vigorosamente a diferenciação direta de iPSCs em linhagens celulares endócrinas do pâncreas através da reprodução *in vivo* de processos de desenvolvimento deste órgão (Kondo et al., 2017).

Têm sido desenvolvidas estratégias para mimetizar e reproduzir *in vitro* as fases normais de desenvolvimento do pâncreas através da manipulação da expressão de fatores de transcrição chave envolvidos, com o objetivo de induzir a diferenciação de iPSCs em

células da linhagem pancreática com potencial terapêutico para a diabetes (Kondo et al., 2017). A produção de células endócrinas é o maior objetivo, já que são estas as células que têm a capacidade de produzir insulina, e já foi demonstrada a capacidade das células pancreáticas derivadas de iPSCs se diferenciarem em todas as linhagens celulares pancreáticas, incluindo em células endócrinas. Foi igualmente demonstrado que ao fim de 3 a 4 meses após ter sido colocado um implante num ratinho imunodeficiente, as células produzidas a partir das iPSCs conseguiram diferenciar-se *in vivo* em células β adultas com a capacidade de estimular a secreção de insulina na presença de glucose (Toyoda et al., 2015). Outro grupo de investigadores demonstrou também que quando as células produzidas a partir de iPSCs foram implantadas nas subcápsulas renais de um ratinho imunodeficiente, as células β que constituíam o enxerto começaram a secretar insulina mediante as mudanças dos níveis de glucose sanguíneos, mas neste estudo esta resposta iniciou-se 2 semanas após a colocação do implante. Verificaram ainda que as células conseguiram melhorar os níveis de glucose por mais de 18 semanas nestes modelos animais (Pagliuca et al., 2014). Entre muitos estudos neste âmbito, foi reportado por outro grupo de investigadores que a regulação rigorosa do momento de decisão da diferenciação celular da endoderme pancreática para células endócrinas é fundamental para se obterem células β pancreáticas derivadas de iPSCs com a capacidade de desencadear a produção de insulina em resposta à presença de glucose (Shahjalal et al., 2014).

Têm sido desenvolvidas e estudadas estratégias de diferenciação para a produção de linhagens endócrinas pancreáticas a partir de iPSCs pela mimetização do desenvolvimento destas *in vivo*, bem como para o desenvolvimento de células β funcionais capazes de produzir insulina através, por exemplo, da identificação de compostos químicos com a capacidade de induzir a diferenciação das iPSCs em células da linhagem pancreática. Diferentes métodos de transplante destas células também têm sido alvo de estudo, como por exemplo métodos em que as células pancreáticas induzidas são transplantadas diretamente para o doente ou abordagens em que este processo se realiza através da colocação de um implante, de modo a averiguar qual o processo mais seguro e eficaz. Contudo, apesar destes numerosos avanços relevantes na área da diabetes, existem ainda algumas questões que precisam de ser ultrapassadas (revisto em Kondo et al., 2017).

Os tratamentos existentes para as doenças neurodegenerativas, de um modo geral, limitam-se ao alívio de alguns sintomas e na maioria dos casos não conseguem impedir a progressão da doença. Por estas razões existem ainda grandes lacunas nos tratamentos de muitas doenças neurodegenerativas e, por isso, a diferenciação de iPSCs em várias linhagens neurais tem sido largamente estudada (Payne et al., 2014). As iPSCs têm a capacidade de se diferenciarem em CE neurais, em CE da crista neural e, consequentemente, em linhagens neurais específicas (Hirschi et al., 2014). Ao longo do tempo já foram derivadas iPSCs humanas a partir de fibroblastos de doentes com doença de Parkinson, doença de Alzheimer e com esclerose múltipla, por exemplo, e posteriormente diferenciadas *in vitro* em tipos celulares relevantes para cada doença, incluindo em neurónios motores, neurónios dopaminérgicos e oligodentrócitos (Payne et al., 2014; Wernig et al., 2008; Tabar & Studer, 2014).

Uma das doenças neurodegenerativas mais comuns é a doença de Parkinson, que se caracteriza pela perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na substância nigra (Payne et al., 2014). Nos últimos 20 anos, a terapia celular de substituição a nível experimental com modelos animais tem demonstrado potencial para poder vir a ser uma opção de tratamento viável para os doentes com esta patologia. Isto porque já foi demonstrado que as iPSCs reprogramadas a partir de fibroblastos de ratinhos têm a capacidade de se diferenciarem em neurónios funcionais *in vitro* e que as células precursoras neurais derivadas destas iPSCs conseguem migrar para diferentes regiões do cérebro e, posteriormente, diferenciarem-se em neurónios e outras células neurais. Verificou-se ainda que os neurónios dopaminérgicos daqui derivados podem melhorar o comportamento de ratinhos com doença de Parkinson (Wernig et al., 2008). Nesta área das doenças neurodegenerativas são utilizadas sobretudo células estaminais neurais induzidas. Recentemente, um grupo de investigadores utilizou enxertos constituídos por estas células como terapia celular em ratinhos com doença de Parkinson submetendo-os ainda a injeções de 6-hidroxidopamina e verificaram que com este procedimento o ratinho teve melhoras ao nível do seu desempenho motor. Confirmaram ainda, recorrendo à utilização de marcadores biológicos, que as células estaminais neurais induzidas presentes no enxerto sobreviveram, migraram e se diferenciaram em células neurais, nomeadamente em neurónios dopaminérgicos. 12 semanas após o tratamento não houve formação de tumores, o que vem reforçar que este tipo de tratamento além de parecer ser eficaz também mostra evidências de ser seguro (Choi et al., 2017).

As CE da crista neural são células multipotentes e têm também sido exploradas na investigação da diferenciação de iPSCs para a regeneração de tecidos neurais, de modo a poderem ser utilizadas no tratamento de doenças como a disautonomia familiar (Lee et al., 2009). Estas CE da crista neural produzidas a partir de iPSCs têm a capacidade de se diferenciarem em células Schwann e, por isso, conseguem promover a mielinização e consequentemente a regeneração funcional de nervos periféricos. Esta evidência é promissora para o desenvolvimento de terapias celulares para doenças desmielinizantes, como no caso da esclerose múltipla (Wang et al., 2011).

7.2. Primeiro ensaio clínico com células estaminais pluripotentes induzidas humanas

Até recentemente existiam inúmeros trabalhos experimentais publicados com iPSCs humanas e derivadas de animais, no entanto todos os ensaios eram realizados em modelos animais e portanto ainda não tinha sido efetuado nenhum ensaio clínico com base nestas células. Em 2014, pela primeira vez, iniciou-se um ensaio clínico com base em iPSCs humanas pelo *RIKEN Center for Development Biology*, localizado no Japão, com o objetivo de testar o potencial médico destas células no tratamento da degeneração macular da idade (DMI) (Angelos & Kaufman, 2015).

A DMI caracteriza-se por ser uma doença degenerativa da mácula (área central da retina) em que se verifica a perda do epitélio pigmentar da retina e que, desta forma, pode conduzir à cegueira (Rawat & Singh, 2017). Esta doença pode categorizar-se de três formas: DMI precoce, DMI seca e DMI exsudativa. Entre 7 a 8% da cegueira em todo o mundo está relacionada com esta doença, sendo que chega a ser a causa mais comum desta nos países desenvolvidos, sobretudo em pessoas com mais de 60 anos. Estes números tendem a aumentar como consequência do envelhecimento da população (Wong et al., 2014).

Apesar de ao longo do tempo terem havido avanços significativos ao nível do tratamento da DMI, os tratamentos continuam a implicar riscos muito elevados ou a apresentar uma baixa eficácia quando são descontinuados. No âmbito da terapia celular de substituição, nos anos 90 realizaram-se transplantes alogénicos de células do epitélio pigmentar da retina (EPR) derivados de fetos humanos, no entanto a rejeição ocorria com frequência. Cerca de uma década mais tarde foi realizado um transplante autólogo destas

células e, apesar de a visão do doente ter sido preservada a longo prazo, o procedimento cirúrgico implicava um risco elevado de hemorragia massiva e de descolamento da retina (revisto em Mandai et al., 2017). Com o objetivo de ultrapassar estes problemas associados aos tratamentos já existentes, um grupo de investigadores, incluindo Takahashi e Yamanaka que têm vindo a estudar o potencial das iPSCs na reconstrução de tecidos doentes há mais de uma década, iniciaram um ensaio clínico onde foram transplantadas células EPR derivadas de iPSCs em doentes com DMI exsudativa com o fim de impedir a progressão da doença e melhorar a visão dos doentes (Mandai et al., 2017; Cyranoski, 2013).

No ano de 2013 foi iniciado o estudo clínico e recrutado o primeiro doente – uma mulher japonesa com 77 anos diagnosticada com DMI (Mandai et al., 2017). Inicialmente foram reprogramadas células retiradas da pele da doente para conceber iPSCs, de seguida foi induzida a diferenciação destas em células EPR e posteriormente colocadas em cultura para crescimento de modo a formarem uma camada de células para posterior implante. Desta forma foram produzidas células EPR a partir de iPSCs humanas derivadas a partir de fibroblastos autólogos, isto é, específicos do doente (Angelos & Kaufman, 2015). As células EPR derivadas das iPSCs foram submetidas a avaliações quanto à sua qualidade e segurança antes de se proceder à sua utilização no transplante. Em 2014 foi finalmente submetida ao transplante das células EPR derivadas das iPSCs (Mandai et al., 2017). No mesmo ano foi recrutado um segundo doente, no entanto foram detetadas 3 anomalias no número de cópias de ADN (deleções) que poderiam vir a afetar a expressão de genes, sobretudo uma delas, dado que se tratava de uma deleção no cromossoma X e, sendo o doente do sexo masculino, foi a que gerou mais preocupação. Com estas variações genéticas que ocorreram nas iPSCs e nas células EPR derivadas destas, o doente acabou por não ser submetido ao transplante (Mandai et al., 2017; Shi, Inoue, Wu & Yamanaka, 2017).

Entretanto, antes de serem publicados quaisquer resultados deste primeiro transplante do ensaio clínico, os investigadores para aferirem o perfil de segurança destas células utilizaram um ratinho imunodeficiente com o objetivo de testarem o seu potencial oncogénico. Verificaram que não houve formação de tumores, nem foram detetadas novas inserções, deleções ou alterações no número de cópias de ADN. Confirmaram também que o ADN do plasmídeo utilizado não foi integrado no ADN genómico (revisto em Mandai et al., 2017).

Passado um ano da realização do transplante, foram analisados os resultados relativamente à segurança do procedimento. Os investigadores não observaram sinais de rejeição nem de que a membrana neovascular – previamente removida – tivesse reaparecido. Exames realizados indicaram a presença de células EPR funcionais. No período de pós-operatório tinha sido detetado um edema macular que apesar de ter desaparecido logo após a cirurgia, reapareceu 4 semanas mais tarde. Perante este problema foi aumentada a dose de glucocorticoides do colírio e o edema diminuiu, ainda que tenha persistido sem mudanças preocupantes ao longo do tempo. Em suma, após um ano não se verificaram complicações graves, nem uma proliferação inesperada das células ou qualquer sinal de doença maligna. Durante o ano de estudo após o transplante não foram observados sinais de rejeição, tal como na avaliação mais recente em dezembro de 2016, realçando que a doente não foi submetida a imunossuppressores, apesar de alguns estudos indicarem que as células autólogas derivadas de iPSCs podem desencadear reações imunológicas, o que constitui portanto um resultado positivo (Mandai et al., 2017).

Quanto à eficácia, passado um ano de a cirurgia ter sido realizada, a acuidade visual da doente não melhorou nem piorou, embora os investigadores admitam que este resultado poderia ter sido conseguido sem cirurgia. A doente sentiu que ficou sobretudo com a visão mais clara, o que se pode dever à remoção da membrana neovascular (Mandai et al., 2017).

Com este trabalho, os investigadores realizaram pela primeira vez um transplante para tratar a DMI com células autólogas, ou seja, células derivadas a partir de células do próprio doente (Mandai et al., 2017). Entretanto, no fim de 2015 foi emitido um comunicado pelo *Foundation for Biomedical Research and Innovation – RIKEN* com a informação de que este ensaio clínico foi interrompido devido a uma mudança nas *guidelines* japonesas referentes à medicina regenerativa (Foundation for Biomedical Research and Innovation – RIKEN, 2015). No entanto, a vontade de progredir nesta área é constante e, por isso, os investigadores liderados por Masayo Takahashi e por Yasuo Kurimoto propuseram a realização de um novo ensaio clínico com o objetivo de testar uma terapia com base em iPSCs, mas desta vez derivadas a partir de células de doadores anónimos e receberam luz verde para iniciarem o ensaio clínico em 5 doentes japoneses com DMI exsudativa (Cyranoski, 2017).

Em Março de 2017, foi realizado o primeiro transplante deste ensaio clínico, onde um homem japonês com 60 anos se tornou na primeira pessoa a receber um transplante de células derivadas de iPSCs concebidas a partir de células de um doador anónimo. Neste caso, foram reprogramadas células da pele do doador em iPSCs que, por sua vez, foram induzidas a diferenciarem-se para células EPR e, posteriormente, realizou-se o transplante destas células para a retina do doente com a patologia. Ainda não foram publicados quaisquer resultados relativos a esta intervenção cirúrgica pioneira. Segundo declarações de Takahashi, a cirurgia correu bem mas o sucesso desta só pode ser declarado depois de uma meticolosa monitorização destas células transplantadas ao longo do tempo. Afirmou ainda que só serão feitas mais declarações quando os 5 doentes incluídos no ensaio tiverem sido submetidos ao procedimento planeado. Tal como no estudo anterior, espera-se que os resultados sejam positivos na medida em que impeçam a progressão da doença (Cyranoski, 2017).

Um das maiores ambições dos investigadores na área da medicina regenerativa é a criação de biobancos de larga escala que permitam o armazenamento de iPSCs, ou de preferência de iPSCs já diferenciadas para diferentes tipos de células progenitoras que depois possam dar origem a células de determinadas linhagens. Idealmente, estes tipos de biobancos seriam constituídos por iPSCs de diversos doadores e poderiam tornar os transplantes de CE mais convenientes de realizar, enquanto se reduziriam os custos, o tempo e a complexidade da preparação destas células e ficariam disponíveis preparações celulares consistentes para se poderem efetuar múltiplos estudos de segurança e eficácia (Cyranoski, 2017; Grskovic et al., 2011).

Neste último estudo, cujo procedimento envolve um transplante alogénico, dado que foram utilizadas iPSCs desenvolvidas a partir de células de um doador, a probabilidade de ocorrer uma rejeição imunológica aumenta porque estas células não proporcionam uma correspondência genética exata ao contrário do que se verificaria se as iPSCs fossem derivadas a partir de células do próprio doente. No entanto, segundo Yamanaka, se forem desenvolvidos biobancos com uma ampla variedade de iPSCs depositadas, será possível encontrar correspondências suficientes para a maioria das aplicações pretendidas (Cyranoski, 2017).

8. Principais preocupações e perspectivas futuras na implementação clínica das iPSCs

As iPSCs teoricamente têm um potencial enorme para serem utilizadas como fonte celular na prática clínica, sobretudo na área da terapia celular. No entanto, quando se projeta a sua utilização para a realidade surgem algumas preocupações, nomeadamente no que diz respeito à segurança e eficácia.

Os processos de reprogramação celular e de diferenciação das iPSCs são processos cruciais e delicados, pois é durante estas fases do desenvolvimento de iPSCs que podem surgir acidentalmente alterações genómicas e aumentar o potencial oncogénico das células. É portanto essencial a caracterização e qualificação das anomalias genómicas adquiridas pelas células durante a reprogramação, cultura e diferenciação para se garantir que as células produzidas são funcionais, puras e apropriadas para serem utilizadas tanto para fins de investigação como para fins terapêuticos; assim como que se compreendam melhor os mecanismos biológicos subjacentes à reprogramação celular e outros mecanismos que levam as células ao seu estado indiferenciado para transformá-las em células ou tecidos diferenciados. (Robinton & Daley, 2012; Turinetto, Orlando & Giachino, 2017; Aznar & Tudela, 2016). Para que estas células sejam passíveis de serem utilizadas na prática clínica é importante que seja assegurada a sua segurança e que se otimizem ao máximo os complexos processos envolvidos na sua produção e desenvolvimento, de modo a haver produção de linhas de iPSCs consistentes. Assim, para que se consiga atingir todo o potencial que estas células podem ter, é crucial que haja consenso quanto ao melhor procedimento e mais consistente para a produção de iPSCs mais seguras e confiáveis, e utilizar protocolos mais uniformes e controlos mais rigorosos para que haja uma boa reprodutibilidade na produção das iPSCs entre diferentes laboratórios. Desta forma, seriam produzidas linhas celulares padronizadas que poderiam ser utilizadas com maior confiança nos estudos básicos e experimentais (Robinton & Daley, 2012). Têm-se estudado ao longo do tempo diferentes abordagens que admitam melhorar a eficiência e a reprodutibilidade da produção de iPSCs. A descoberta de fatores de pluripotência humanos específicos em conjunto com procedimentos de reprogramação adequados é uma delas, já que podem ajudar a produzir linhas de iPSCs de elevada qualidade (revisto em Ortmann & Vallier, 2017). O tempo de cultura é outro fator que os investigadores associam à formação de anomalias genómicas e, por isso, seria também benéfico recorrer a procedimentos que o minimizem (Robinton & Daley, 2012).

O maior potencial terapêutico das iPSCs foca-se especialmente na sua obtenção a partir do próprio doente (células autólogas), já que estas podem oferecer significativas vantagens como o menor risco de rejeição imunológica após o transplante, que constitui também uma grande preocupação nesta área (Aznar & Tudela, 2016). Contudo já foi demonstrado por diversos estudos, inclusivamente por um realizado por Yamanaka e pelos colegas, que o processo de diferenciação pode provocar defeitos nas linhas individuais de iPSCs humanas produzidas e, por isso, representar uma ameaça devido à possibilidade de favorecer a formação de tumores após o transplante. Estas alterações que se manifestam por anomalias na expressão génica devem ser, por esta razão, identificadas e eliminadas das iPSCs antes destas serem utilizadas para aplicações na medicina regenerativa (Brandl et al., 2014; Koyanagi-Aoi et al., 2013). Sendo que o risco de reação imunológica constitui uma das maiores preocupações nos transplantes de CE, foram propostas algumas abordagens para limitar este risco. Uma das abordagens mais promissoras é a criação de biobancos de iPSCs humanas com base no genótipo HLA à semelhança do que é feito atualmente para as células estaminais do cordão umbilical utilizadas para transplante de células hematopoiéticas. Entretanto, esta abordagem já foi posta em prática no Japão onde os investigadores conceberam um biobanco de iPSCs humanas homozigóticas para o gene HLA, e que pressupõem que apenas 50 linhas destas iPSCs seriam suficientes para abranger cerca de 91% de toda a população japonesa com compatibilidade para 3 locus de HLA (revisto em Angelos & Kaufman, 2015; Nakatsuji, Nakajima & Tokunaga, 2008).

O conhecimento incompleto dos mecanismos fisiopatológicos de algumas doenças, principalmente das neurodegenerativas, deve-se em grande parte ao facto de os modelos animais existentes serem pouco representativos para permitirem estudar a doença com alguma precisão. Para que se consiga fazer uma seleção apropriada de abordagens para a terapia celular, é essencial que a fenotipagem dos doentes seja melhorada através de abordagens fisiopatológicas, genéticas e imagiológicas. Na prática clínica, para que estas células pluripotentes sejam passíveis de ser utilizadas é essencial que primeiramente seja selecionada a doença alvo da terapia celular, que sejam identificados os fenótipos relevantes para a patologia e que a diferenciação das iPSCs seja direcionada para um fenótipo relevante. Na realidade, estes aspetos constituem ainda grandes desafios nesta área (Robinton & Daley, 2012).

É importante que qualquer técnica ou procedimento clínico que seja proposto com base em iPSCs seja competitivo relativamente às terapias já existentes, tanto a nível de eficácia como de segurança, para que seja passível de ser aplicado na prática (Tabar & Studer, 2014).

O aparecimento de regulamentação por parte de entidades reguladoras como a FDA (*Food and Drug Administration*) referentes à utilização de terapias celulares com base em iPSCs em ensaios clínicos era indispensável, tendo em conta as preocupações existentes com os potenciais riscos de atividade biológica prolongada, a indução de respostas imunológicas e o envolvimento de procedimentos relativamente invasivos que envolvem esta área de estudo. Surgiu assim, em 2015, uma norma de orientação por parte do Centro de Avaliação e Pesquisa de Produtos Biológicos (Center for Biologics Evaluation and Research) da FDA intitulada de “Considerações para o *design* de ensaios clínicos de fase inicial de produtos de terapia celular e genética” onde são expressadas estas preocupações (FDA, 2015).

No futuro, o surgimento de inovações técnicas na área cirúrgica, como a criação de técnicas e sistemas minimamente invasivos, ou como o desenvolvimento de técnicas que permitam a monitorização e visualização do órgão ou tecido alvo durante o procedimento através, por exemplo, de uma ressonância magnética em tempo real irão beneficiar também as técnicas de transplante com iPSCs e torná-las mais seguras. É fundamental que a eficácia e a segurança deste tipo de abordagem na medicina regenerativa sejam melhoradas e é precisamente nesse sentido que estão a ser desenvolvidos métodos para melhorar a migração das células *in vivo*, bem como a integração dos enxertos compostos por estas células no hospedeiro (Aznar & Tudela, 2016; Tabar & Studer, 2014).

Em suma, para que haja mais segurança e confiança na utilização futura de células derivadas de iPSCs em terapias celulares, é fundamental preencher a lacuna de ensaios clínicos que existe com estas células. Para a implementação de abordagens baseadas em iPSCs humanas na medicina regenerativa é crucial a formação de equipas multidisciplinares de clínicos e cientistas peritos em diferenciação direta, bem como a conjugação de conceitos de engenharia de tecidos com esta área (Tabar & Studer, 2014). Para que se consigam desenhar ensaios clínicos e para simplificar o uso destas células em terapias celulares, existem ainda algumas barreiras e desafios que devem ser ultrapassados. Para isso, é fundamental que haja, sobretudo, uma produção de forma padronizada, eficiente, em número suficiente e de acordo com as cGMPs (*current Good*

Manufacturing Practices) para assegurar consistência e reprodutibilidade das células produzidas; e os processos de produção destas células para uso terapêutico devem ter uma supervisão rigorosa e regulada. Antes das células derivadas de iPSCs receberem qualquer tipo de aprovação por entidades reguladoras para serem utilizadas em ensaios clínicos, devem ser submetidas a testes genéticos detalhados que testem o potencial oncogénico e a imunogenicidade, bem como a testes microbiológicos e toxicológicos (figura 7; Angelos & Kaufman, 2015; Ortmann & Vallier, 2017).

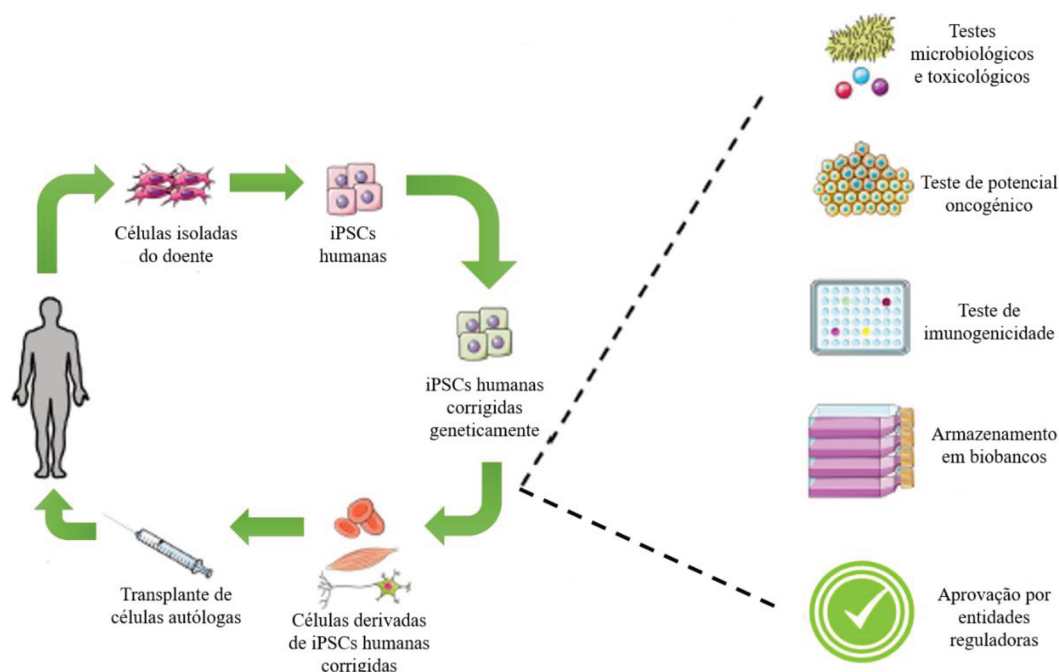


Figura 7: Estratégia clínica para a realização de ensaios clínicos com células derivadas iPSCs para aplicação em terapias celulares (adaptado de Angelos & Kaufman, 2015).

A produção, identificação e análise de linhas de iPSCs humanas transplantáveis seguras na prática carecem da realização de muitos estudos, com um custo bastante elevado, para cada transplante celular que se pretenda fazer. O estudo clínico realizado no Japão referido anteriormente, revelou que o custo de tratamento por doente foi cerca de 512,000 \$ US, o que se torna demasiado dispendioso e insustentável para se tornar uma prática clínica acessível (revisto em Brandl et al., 2014).

CONCLUSÃO

Tendo em conta a capacidade das células estaminais pluripotentes de proliferar em cultura e da sua aptidão de dar origem a quaisquer células ou tecidos do organismo, considera-se que têm um enorme potencial para funcionar como fonte celular no desenvolvimento de novas terapias celulares. A utilização de CE embrionárias gera controvérsia e opiniões divididas, pois se por um lado possuem grandes potencialidades para variadas aplicações, sobretudo na medicina e investigação, por outro suscitam questões éticas e morais associadas sobretudo à forma como são obtidas. Há cerca de uma década, com a descoberta das iPSCs surgiu também uma possível fonte celular que poderia vir a substituir as CE embrionárias na grande parte das suas aplicações, já que se vieram a verificar bastantes semelhanças entre estes dois tipos de células pluripotentes, apresentando também um grande potencial na área da medicina, com a vantagem de que as iPSCs superam estas questões éticas associadas às CE embrionárias.

Ao surgirem as iPSCs, a reprogramação celular provou tratar-se de uma ferramenta indispensável para a transformação de células diferenciadas para um estado de pluripotência, e o rápido avanço nas tecnologias de reprogramação conduziu a novas oportunidades para a aplicação destas células na medicina regenerativa, em modelos de doença e na pesquisa de fármacos. Contudo, para se beneficiar do potencial destas células é imprescindível a melhoria dos processos de reprogramação e diferenciação destas células, bem como da compreensão dos mecanismos subjacentes a estes, dado que estão muitas das vezes associados ao aparecimento de anomalias genómicas e à formação de tumores. Esta melhoria deve ser feita com o intuito de se conseguir manipular o processo de uma forma adequada, assim como para melhorar a eficácia, o rigor, a qualidade e a consistência da reprogramação celular. Com o objetivo de tornar as iPSCs mais seguras e estáveis geneticamente poderem ser utilizadas na terapia celular, tem sido dedicado muito tempo e estudo à otimização das técnicas de reprogramação.

A medicina regenerativa engloba processos de substituição, de engenharia ou de regeneração de células humanas, tecidos ou órgãos com o objetivo de restabelecer o funcionamento normal destes. É uma área bastante complexa mas que tem suscitado grandes expectativas quanto a novas abordagens terapêuticas. Os produtos celulares utilizados nesta área são derivados de CE, particularmente de iPSCs. Desde que foram descobertas, estas células trouxeram novas possibilidades de abordagens nestas áreas nas

quais os investigadores confiam que poderão ser aplicadas com mais estudos que garantam a sua segurança e eficácia. Porém, sucederam-se também alguns fracassos, principalmente quanto à sua aplicação na prática clínica, que atrasam o seu uso promissor na medicina regenerativa, mas que não as desvalorizam quanto às suas diversas possibilidades de aplicações na área experimental da medicina. A investigação e a utilização das iPSCs para o estudo fisiopatológico de doenças, bem como para o desenvolvimento de modelos de doença e de terapias celulares tem sido feita sobretudo para doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, doenças cardiovasculares, diabetes e para degeneração macular da idade.

Depositam-se esperanças na possibilidade das iPSCs poderem vir a ser utilizadas para a formação e regeneração de tecidos, sob a forma de transplante em doentes com lesões em tecidos ou órgãos. O seu uso a partir de células do doente, isto é, em condições autólogas, limita a necessidade de terapêutica imunossupressora, trazendo a possibilidade de ultrapassar a preocupação da rejeição imunológica.

Espera-se que sejam realizados mais estudos e ensaios clínicos como um que está a decorrer atualmente no Japão com doentes com DMI, e que estes estabeleçam o caminho para mais aplicações da tecnologia das iPSCs. Enquanto a sua aplicação em terapias celulares ainda não é compreendida o suficiente para a realização de mais ensaios clínicos e para ser utilizada na prática, é utilizada com sucesso em modelos de doenças e na pesquisa de fármacos. Permite também adquirir novos conhecimentos e novas perspetivas relativamente à forma como órgãos e tecidos podem vir a ser substituídos no futuro.

Apesar de ainda não serem totalmente compreendidas, existe consenso quanto aos benefícios que as iPSCs podem ter e, por isso, é contínua a procura por parte dos investigadores de novas terapias e tratamentos com esta tecnologia. Para a prática clínica, assim que sejam criados métodos de controlo de segurança e eficácia, as iPSCs têm potencial para serem utilizadas em doenças cujo tratamento até então era somente sintomático ou em patologias consideradas até então sem cura.

BIBLIOGRAFIA

- Angelos, M. G., & Kaufman, D. S. (2015, Dezembro). Pluripotent stem cell applications for regenerative medicine. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 20(6), 663–670. Disponível em: <http://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000244>
- Arjmand, B., Goodarzi, P., Mohamadi-jahani, F., Falahzadeh, K., & Larijani, B. (2017). Personalized Regenerative Medicine. *Acta Medica Iranica*, 55(3), 144–149. Disponível em: <http://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/6212>
- Aznar, J., & Tudela, J. (2016). Ten years since the discovery of iPS cells : The current state of their clinical application. *Revista Clínica Española*, 217(1), 30–34. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.rceng.2016.10.002>
- Beevers, J. E., Caffrey, T. M., & Wade-martins, R. (2013). Induced pluripotent stem cell (iPSC) - derived dopaminergic models of Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1503–1508. Disponível em: <http://doi.org/10.1042/BST20130194>
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue Engineering and Regenerative Medicine : History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 403–430. Disponível em: <http://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Bragança, J., Tavares, Á., & Belo, J. A. (2010, Dezembro). Células estaminais e medicina regenerativa, um admirável mundo novo. *Revista Da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 7, 4–17. Disponível em: http://www.spn.org.pt/docs/canal%20bq_stem%20cells.pdf
- Brandl, B., Schneider, S. A., Loring, J. F., Hardy, J., Gribbon, P., & Muller, F.-J. (2014). Stem Cell Reprogramming : Basic Implications and Future Perspective for Movement Disorders. *Movement Disorders*, 0(0), 1–12. Disponível em: <http://doi.org/10.1002/mds.26113>
- Choi, D., Kim, J., Kim, S. M., Kang, K., Han, D. W., & Lee, J. (2017). Therapeutic Potential of Induced Neural Stem Cells for Parkinson's Disease. *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 224. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/ijms18010224>
- Correia, R., & Bragança, J. (2010, Dezembro). Células estaminais adultas em medicina. *Revista Da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 7, 18–23. Disponível em: http://www.spn.org.pt/docs/canal%20bq_stem%20cells.pdf
- Cyranoski, D. (2013, Fevereiro). Stem cells cruise to clinic. *Nature*, 494, 413. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/494413a>
- Cyranoski, D. (2017, Março). Japanese man is first to receive “reprogrammed” stem cells from another person. *Nature*. Disponível em: <https://www.nature.com/news/japanese-man-is-first-to-receive-reprogrammed-stem-cells-from-another-person-1.21730>
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a Single Transfected cDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts. *Cell*, 51, 987–1000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X)
- Draft guidance for industry: considerations for the design of early-phase clinical trials of cellular and gene therapy products (2015). *US Department of Health and Human Services. The Food and Drug Administration*. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM564952.pdf>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154–156. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/292154a0>
- Foundation for Biomedical Research and Innovation – RIKEN (2015, novembro). Termination of subject enrolment for the “Clinical study of autologous induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium (RPE) cell sheets for exudative age-related macular degeneration (AMD)”. Acedido a 13 de outubro de 2017, disponível em: <http://www.riken-ibri.jp/AMD/img/20151125en.pdf>

- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., & Daley, G. Q. (2011, Dezembro). Induced pluripotent stem cells — opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(12), 915–929. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nrd3577>
- Gurdon, J. B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles, 10(4), 622–640.
- Halley-Stott, R. P., Pasque, V., & Gurdon, J. B. (2013). Nuclear reprogramming. *Development*, 140(12), 2468–2471. Disponível em: <http://doi.org/10.1242/dev.092049>
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J. P., ... Jaenisch, R. (2007, Dezembro). Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science*, 318(5858), 1920–1923. <http://doi.org/10.1126/science.1152092>
- Hirschi, K. K., Li, S., & Roy, K. (2014). Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16, 277–294. Disponível em: <http://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105108>
- Jain, A., & Bansal, R. (2015). Applications of regenerative medicine in organ transplantation. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 7(3), 188–194. Disponível em: <http://doi.org/10.4103/0975-7406.160013>
- Karakikes, I., Ameen, M., Termglinchan, V., & Wu, J. C. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 117(1), 80–89. Disponível em: <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365>
- Kawamura, M., Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, A., Miki, K., Ito, E., ... Sawa, Y. (2013). Enhanced Survival of Transplanted Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes by the Combination of Cell Sheets With the Pedicled Omental Flap Technique in a Porcine Heart. *Circulation*, 128(11), S87–S94. Disponível em: <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000366>

- Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., ... Sawa, Y. (2012). Feasibility, Safety, and Therapeutic Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Sheets in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model. *Circulation*, 126(11), S29--S37. Disponível em: <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084343>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85, 3–10. Disponível em: <http://doi.org/10.1159/000345615>
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634250/>
- Kondo, Y., Toyoda, T., Inagaki, N., & Osafune, K. (2017, Junho). iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*, 1–10. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/jdi.12702>
- Koyanagi-Aoi, M., Ohnuki, M., Takahashi, K., Okita, K., Noma, H., Sawamura, Y., ... Yamanaka, S. (2013, Dezembro). Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20569–20574. Disponível em: <http://doi.org/10.1073/pnas.1319061110>
- Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., ... Loring, J. F. (2011, Janeiro). Resource Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ESCs and iPSCs during Reprogramming and Time in Culture. *Cell Stem Cell*, 8(1), 106–118. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.003>
- Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Mark, J., Fasano, C. A., ... Studer, L. (2009, Setembro). Modeling Pathogenesis and Treatment of Familial Dysautonomia using Patient Specific iPSCs. *Nature*, 461(7262), 402–406. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nature08320>
- Lu, T., Lin, B., Kim, J., Sullivan, M., Tobita, K., Salama, G., & Yang, L. (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem

- cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature Communications*, 4, 1–11. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/ncomms3307>
- Lu, X., & Zhao, T. (2013). Clinical Therapy Using iPSCs: Hopes and Challenges. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(5), 294–298. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.09.002>
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., ... Takahashi, M. (2017, Março). Autologous Induced Stem-Cell–Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, 376(11), 1038–1046. Disponível em: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368>
- Mao, A. S., & Mooney, D. J. (2015). Regenerative medicine : Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), 14452–14459. Disponível em: <http://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 78(12), 7634–7638.
- Mason, C., & Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, 3(1), 1–5. Disponível em: <http://doi.org/https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1>
- Mcculloch, E. A., & Till, J. E. (2005, Outubro). Perspectives on the properties of stem cells. *Nature Medicine*, 11(10), 1026–1028. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nm1005-1026>
- Miguel-Beriain, I. De. (2014). The ethics of stem cells revisited. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.011>
- Mora, C., Serzanti, M., Consiglio, A., Memo, M., & Era, P. D. (2017). Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biology and Toxicology*, 33(4), 351–360. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s10565-017-9384-y>

- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flügel, L., ... Laugwitz, K.-L. (2010, Outubro). Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 363(15), 1397–1409. Disponível em: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0908679>
- Nakatsuji, N., Nakajima, F., & Tokunaga, K. (2008). HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nature Biotechnology*, 26(7), 739–740. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nbt0708-739>
- Nerem, R. M. (2011). Tissue engineering: from basic biology to cell-based applications. In S. Li, N. L'Heureux, & J. Elisseeff (Eds.), *Stem Cell and Tissue Engineering* (pp. 1-8). Singapore: World Scientific Publishing.
- Ortmann, D., & Vallier, L. (2017, Junho). Variability of human pluripotent stem cell lines. *Current Opinion in Genetics & Development*, 46, 179–185. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.004>
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., ... Melton, D. A. (2014, Outubro). Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell*. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>
- Payne, N. L., Sylvain, A., Brien, C. O., Herszfeld, D., Sun, G., & Bernard, C. C. A. (2014). Application of human induced pluripotent stem cells for modeling and treating neurodegenerative diseases. *New Biotechnology*. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.05.001>
- Rawat, N., & Singh, M. K. (2017). Induced pluripotent stem cell: A headway in reprogramming with promising approach in regenerative biology. *Veterinary World*, 10(6), 640–649. Disponível em: <http://doi.org/10.14202/vetworld.2017.640-649>
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012, Janeiro). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481, 295–305. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nature10761>
- Shahjalal, H., Shiraki, N., Sakano, D., Kikawa, K., Ogaki, S., Baba, H., ... Kume, S. (2014, Maio). Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells in

- a defined and completely xeno-free culture system. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(5), 394–408. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/jmcb/mju029>
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 115–130. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- Tabar, V., & Studer, L. (2014). Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nature Reviews. Genetics*, 15(2), 82–92. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nrg3563>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131, 861–872. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126, 663–676. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2013). Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*, 140(12), 2457–2461. Disponível em: <http://doi.org/10.1242/dev.092551>
- Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., ... Mckay, R. D. G. (2007, Julho). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448, 196–199. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nature05972>
- Thomson, J. A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282, 1145–1148.
- Toyoda, T., Mae, S.-I., Tanaka, H., Kondo, Y., Funato, M., Hosokawa, Y., ... Osafune, K. (2015). Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs

- into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Research*, 14, 185–197. Disponível em: <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.01.007>
- Turinetto, V., Orlando, L., & Giachino, C. (2017, Setembro). Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). Disponível em: <http://doi.org/10.3390/ijms18091952>
- Tweedell, K. S. (2017). The Adaptability of Somatic Stem Cells : A Review. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, 13(1), 3–13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5494437/>
- Wang, A., Tang, Z., Park, I.-H., Zhu, Y., Patel, S., Q Daley, G., & Li, S. (2011). Induced Pluripotent Stem Cells for Neural Tissue Engineering. *Biomaterials*, 32, 5023–5032. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.070>
- Wernig, M., Zhao, J., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., ... Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *PNAS*, 105(15), 5856–5861. Disponível em: <http://doi.org/10.1073/pnas.0801677105>
- Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C., & Wong, T. Y. (2014, Fevereiro). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 2, e106–e116. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](http://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1)
- World Health Organization (2017). Media centre – Diabetes. Acedido a 10 de Outubro de 2017, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
- Yoshida, Y., & Yamanaka, S. (2017, Junho). Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later. *Circulation Research*, 120(12), 1958–1968. Disponível em: <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311080>
- Yu, J., & Thomson, J. A. (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes & Development*, 22, 1987–1997. Disponível em: <http://doi.org/10.1101/gad.1689808.Freely>